DIE TRYPTOPHANREAKTION UND DIE HALOGENVERBINDUNGEN DER INDOLAMINOPROPIONSÄURE.

INAUGURAL-DISSERTATION

WELCHE

ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE

IN DER

MEDIZIN UND CHIRURGIE

MIT ZUSTIMMUNG

DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER

FRIEDRICH-WILHELM-UNIVERSITÄT ZU BERLIN

AM 16. FEBRUAR 1907

NEBST DEN ANGEFÜGTEN THESEN

ÖFFENTLICH VERTEIDIGEN WIRD

DER VERFASSER

NIKOLAUS POPOWSKY.

OPPONENTEN:

Herr Dr. med. Arthur Bloch.

„ Dr. rer. nat. Benno Brahn.

„ Cand. phil. Leonard. C. Scott B. Sc.

VERLAGSBUCHHANDLUNG VON JULIUS SPRINGER IN BERLIN.

1907.

95

Gedruckt mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Königlichen Friedrich-Wilhelm-Universität zu Berlin.

Referent: Geh. Med.-Rat Prof. Dr. Engelmann.

Buchdruckerei E. Buchbinder, Neu-Ruppin.

Im Jahre 1826 haben Tiedemann und Gmelin[1]) eine Reaktion beschrieben, für die nachher die Bezeichnung Tryptophanreaktion geläufig geworden ist. Die genannten Autoren beobachteten eine Rötung, welche Chlorwasser im Pankreassafte des Hundes hervorbringt. Die erste Erwähnung der Reaktion hat folgenden Wortlaut: „Eine durch Chlor, nicht durch Säuren und Salze, sehr selten durch Sublimat, sich rosen- oder pfirsichblütrot färbende Materie wurde fast immer im dünnen Darm gefunden. — Durch Übermaß von Chlor wurde ihre Farbe wieder zerstört. — Diese Materie, welche wir niemals im Magen der Säugetiere gefunden haben, rührt höchstwahrscheinlich von dem pankreatischen Safte her, weil sie auch in diesem gefunden wurde. Da sie sich auch bei mehreren Hunden fand, deren Gallengänge waren unterbunden worden, so kann sie nicht von der Galle herrühren. Da sie nicht mit Exkrementen ausgeleert wird, so muß sie mit den flüssigen Nahrungsmitteln eingesaugt werden. Es ist ferner zu vermuten, daß sie einen gewissen Anteil an der Assimilation der Nahrungsmittel habe."

Seitdem haben sich viele Autoren mit der Frage nach der Natur der sich färbenden Substanz beschäftigt. Claude

---

[1]) Tiedemann und Gmelin, Die Verdauung nach Versuchen. Heidelberg und Leipzig. 1826.

Bernard[1]) fand den Körper bei der tryptischen Verdauung von Kasein, bei der Mazeration von Pankreas, Leber, Milz, Brunnerschen Drüsen, Lymphdrüsen in einem gewissen Stadium der Zersetzung. Er hielt diese Substanz für identisch mit jener, die bei jeder Fäulnis auftritt und sich in der Wärme bei Zusatz von Salpetersäure und Nitrit rot färbt. Claude Bernards Beschreibung betrifft zunächst die im Wasserauszuge der faulenden Pankreasdrüse beobachtete Reaktion:

„Si on laisse la macération du tissu du pancréas se prolonger davantage, on constate après un jour ou deux, que le tissu, en s' alterant, prend une odeur nauséabonde putride; et si l'on y ajoute alors du chlore, on voit se manifester dans le liquide une coloration rouge vineuse plus ou moins intense. Lorsqu'elle est arrivée à un certain degré d' intensité, cette coloration diminue et disparaît sous l'influence d'un excès de chlore, et le liquide prend alors une teinte jaunâtre. Si l'on ne depasse pas la quantité de réactif nécessaire, le liquide reste coloré en rouge, mais le plus ordinairement la matière colorée se précipite par le repos au fond du vase".

Claude Bernard hat die durch Zusatz von Chlor sich bildende rote Verbindung als ein Oxydationsprodukt betrachtet.

„La coloration rouge n'existe pas dans les premièrs moments de l'infusion du tissu pancréatique; elle se produit, comme on le voit, par une décomposition qui s'empare, sans doute, de la matière coagulable du suc pancréatique."

Im Eiter soll nach Boedeker[2]) eine Substanz vorkommen, die in wässeriger Lösung durch verdünntes Chlorwasser zart rosenrot bis intensiv dunkelrot gefärbt wird (zitiert nach Stadelmann).

Kühne[3]) wendete bei dieser Reaktion anstatt Chlorwasser Bromwasser an. Auf Grund seiner Untersuchungen trat er der

---

[1]) Claude Bernard, Mémoire sur le pancréas. Comptes Rendus Supplément I. 1856.

[2]) Ztschr. f. rationelle Medizin. Neue Folge **6**. 1855.

[3]) W. Kühne, Berichte d. D. chem. Gesellsch. **8**, 1. 1875.

von Claude Bernard ausgesprochenen Auffassung entgegen und zeigte, daß es sich bei der von Claude Bernard mit der Chlorwasserreaktion für identisch erklärten, durch Salpetersäure und Nitrit bedingten Rötung um Indol handelt. Ferner zeigte Kühne, daß der fragliche Bromkörper auch bei der Trypsinverdauung unter Ausschluß von Fäulnis entsteht und zwar aus der von ihm so bezeichneten Gruppe der Hemialbumose, nicht der Antialbumose[1]) stammt. Kühne stellt den Körper in eine Reihe mit Leucin und Tyrosin. Auch soll er beim Zerfall des Hemipeptons in Leucin und Tyrosin allen Schwefel aufnehmen. — Kühne war es also, der die Muttersubstanz des gefärbten Halogenkörpers als ein Produkt hydrolytischer Eiweißspaltung erkannte.

Das Verhalten des Farbstoffes gegen chemische Agentien, sowie auch dessen physikalische Eigenschaften untersuchte Krukenberg[2]). Er fand nämlich, daß die von ihm als Chromogen bezeichnete und dem rot-violetten Farbstoffe zugrunde liegende Substanz — sie wurde nachmals von Neumeister Tryptophan genannt und wird auch im weiteren so bezeichnet werden — durch vegetabilisches Pergament dialysiert. Er fand ferner, daß der mit Äther und Chloroform ausgeschüttelte rote Körper ein Absorptionsband um D zeigt. Chlor und Brom rufen nach Krukenberg die Rotfärbung in alkalischer wie essigsaurer Lösung hervor. Jod dagegen erzeugt eine undeutliche Rötung nur in essigsaurer Lösung hervor. Das Halogen ist nach Krukenberg an das Verdauungsprodukt chemisch gebunden.

„Weder durch Ausschütteln mit Chloroform direkt, noch nach vorausgegangenem Ansäuern mit Schwefelsäure findet eine Entfärbung statt. Salpetrige Salpetersäure zerstört indes den Farbstoff und läßt bei anfänglichem Bromzusatz das Brom in Chloroform oder Schwefelkohlenstoff übergehen. Derselbe

---

[1]) W. Kühne und R. H. Chittenden, Ztschr. f. Biol. **19**. 1883 und **20**. 1884.

[2]) C. Fr. W. Krukenberg, Verhandl. der Physikal.-Mediz. Ges. zu Würzburg **18**, 179. 1884.

Spaltungsprozeß ereignet sich beim Schütteln der Bromverbindung mit frisch gefälltem Silberoxyd. Filtriert man in diesem Falle nach mehrmaligem Schütteln den aus Silberoxyd und Bromsilber bestehenden Bodensatz ab, so erhält man ein völlig ungefärbtes Filtrat, welches weder durch Essigsäure, noch durch Ammoniak, stets aber durch neuen Bromzusatz eine Rötung wiedererhält, und dieses selbst dann, wenn bei Darstellung des roten Farbstoffkörpers, der durch Silberoxyd zerstört wurde, mehr als die zu seiner Hervorrufung erforderliche Brommenge hinzugefügt wurde. Hieraus ergibt sich, daß das Brom ein integrierender Bestandteil dieses Farbstoffes ist und nicht nur mittelbar (oxydierend) bei seiner Entstehung beteiligt war“ [1]).

Das Tryptophan ist nach Krukenberg nicht mit Wasserdämpfen flüchtig. Insofern stimmt er mit Kühne überein, als er behauptet, daß die in Verdauungsflüssigkeiten durch Zusatz von Salpetersäure entstehende Rotfärbung von einem anderen Chromogen herrühre, weil das Verhalten gegen Wärme, die Farbentöne und die spektroskopischen Eigenschaften andere sind. Krukenberg äußerte die Ansicht, daß das Tryptophan kein Eiweißkörper, sondern ein Vertreter der Indigogruppe sei.

Lauder Brunton und Em. Bourquelot sprachen die Meinung aus, daß die in tryptischen Verdauungsprodukten durch Chlor- oder Bromwasser erhaltene Färbung durch die Gegenwart von Naphthylamin veranlaßt würde, wogegen sich Hemala wendet, der die Reaktionen des Naphthylamins genauer studierte (zitiert nach Stadelmann). Nach Hemala [2]) verläuft die Reaktion gut in saueren, viel schwächer in neutralen und gar nicht in alkalischen Lösungen (vergl. dagegen Krukenberg). Auch das Verhalten des Bromkörpers zu Solventien ist von Hemala eingehender studiert worden und zwar zeigte er, daß er sich mit abnehmender Intensität in Amylalkohol, Äther,

---

[1]) Virchows Archiv **101**, 558. 1885.

[2]) Rich. Hemala in Krukenbergs Chem. Untersuchung zur wissenschaftl. Medizin **2**. 1888.

Chloroform und Schwefelkohlenstoff löst. Das Tryptophan wird durch siedendes Wasser verhältnismäßig rasch zersetzt.

Nach Neumeister[1]) soll dagegen das Tryptophan gegen siedendes Wasser beständig sein. Er war es, der dem uns interessierenden Verdauungsprodukt den Namen „Tryptophan" beigelegt hat. Außer bei Fäulnis und Verdauung erhielt Neumeister das Tryptophan beim Erhitzen von Eiweißkörpern mit Barytlauge und beim Kochen derselben mit 5%iger Schwefelsäure. Ein zu langes Kochen mit Schwefelsäure sowie eine sehr ausgedehnte Pankreasverdauung scheinen das Tryptophan wieder zu zerstören. Was die Tryptophanreaktion anbetrifft, so verläuft sie am besten in schwach saurer Lösung. In stark saurer Lösung (z. B. 5%iger Schwefelsäure) bleibt die Bildung des Chlor- bezw. des Bromkörpers aus. Der einmal gebildete Körper ist in der Kälte gegen 5%ige Schwefelsäure beständig. Essigsäure soll in beliebiger Konzentration auf die Farbenreaktion ohne Einfluß sein. Ferner gibt Neumeister an, daß nicht nur der Bromkörper, sondern das Tryptophan selbst vom Amylalkohol aufgenommen wird und sich hierdurch seinen Lösungen entziehen läßt. Stadelmann[2]), der diese Methode anwenden wollte, gelang es aber nicht, das Tryptophan zu isolieren. Er wählte für Tryptophan die Bezeichnung Proteinochromogen, für den bei Halogenzusatz entstehenden Farbstoff — Proteinochrom.

Früher wurden die farbigen Tryptophanverbindungen einfach aus den Verdauungsflüssigkeiten mit Brom oder Chlor gefällt. Es entstanden dabei sehr verunreinigte Farbstoffe. Das Bestreben der weiteren Autoren war nunmehr darauf gerichtet, die Verbindung durch verschiedene Kunstgriffe möglichst rein darzustellen. Stadelmann befreite zunächst die Verdauungsflüssigkeit vom Fett mittels Äther, entfernte die Eiweißstoffe durch Koagulation, Leucin und Tyrosin durch Auskristallisation, fällte alsdann den Bromkörper aus und extrahierte ihn mit 90%igem Alkohol. Das Tryptophan wird wenigstens teilweise zerstört, wenn die Ver-

[1]) R. Neumeister, Ztschr. f. Biol. **26**, 329. 1890.
[2]) E. Stadelmann, Ztschr. f. Biol. **26**, 491. 1890.

dauungsprobe mit Schwefelsäure, Salpetersäure, Salzsäure, Natriumhydrat, kohlensaurem Natron und Ammoniak ungefähr bis zum Gehalt von 5 % versetzt und dann gekocht wird. Gegen siedendes Wasser fand es Stadelmann mit Neumeister übereinstimmend im Gegensatz zu Krukenberg und Hemala beständig. Stadelmann unterschied bei der Tryptophanreaktion drei entstehende Körper: einen dunkelvioletten, in Äther löslichen Körper, einen anderen von gleicher Farbe, der in Äther unlöslich, dagegen in Alkohol löslich ist, und einen dritten, der sich in Alkohol nur schwer löst. Bei den Analysen der Bromverbindungen fand Stadelmann den Gehalt an Brom wechselnd, und zwar von 19,77 % bis 35,17 %. Was das Tryptophan selbst anbelangt, so verhält es sich nach ihm wie Pepton. Aus der komplizierten Zusammensetzung, dem starken Schwefelgehalt (4,69 %) [!] und ungemein hohen Kohlenstoffgehalt (61,02 %) schließt Stadelmann, daß bei der Bildung des Tryptophans die Möglichkeit einer Beteiligung von synthetischen Prozessen in Betracht gezogen werden müsse.

Nencki[1]) gelang es, den Bromkörper schon etwas reiner darzustellen. Er fällte die Verdauungsflüssigkeit mit Sublimat aus und befreite sie nach seinen Angaben auf diese Weise von Xanthin, Hypoxanthin und Guanin. Das Tyrosin entfernte er durch Eindampfen. Aus der von den obengenannten Stoffen frei gemachten Lösung fällte Nencki das Tryptophan mittels Bromwasser, entzog dem Bromkörper Fett durch Äther, löste ihn aus Alkohol um und trocknete ihn in vacuo über Schwefelsäure. Die auf diese Weise gewonnene Bromverbindung löste sich in Alkalien und wurde durch Säuren wieder gefällt. Nach Nencki wären mindestens zwei Bromkörper zu unterscheiden: der eine mit roter Farbe sich lösende, in geringer Menge entstehende, zeichnete sich durch hohen Bromgehalt (27 %) und geringen Schwefelgehalt (0,5 %) aus, ein anderer brauner Körper enthielt nach ihm weniger Brom (20,5 %), dagegen bedeutend mehr Schwefel (2,2 %). Die Ähnlichkeit in der Zusammensetzung des roten Körpers, bromfrei berechnet, mit Hämatoporphyrin und

[1]) M. Nencki, Ber. d. D. chem. Gesellsch. **28**. 1. 1895, S. 560.

Bilirubin und die der von Nencki als brauner Körper bezeichneten Verbindung, ebenfalls bromfrei berechnet, mit Hippomelanin, Hippomelaninsäure und dem schwarzen Pigment der Pferdehaare, veranlaßten ihn, die Vermutung auszusprechen, „daß das bei der Einwirkung des Pankreasfermentes auf Eiweiß entstehende Proteinochromogen, oder vielleicht die Proteinochromogene, die Muttersubstanzen der tierischen Farbstoffe sind". Durch Schmelzen der Bromverbindungen mit Kalihydrat erhielt Nencki Pyrrol, Indol und Skatol. Er machte auch den Versuch, den roten Körper durch Eisessig und Zinkstaub zu reduzieren. Dabei entfärbt sich die Lösung. Das Reduktionsprodukt soll nach Nencki noch immer bromhaltig sein. Die inkonstant, jedoch ziemlich hoch gefundene Menge des Schwefels veranlaßte Nencki, die Vermutung auszusprechen, daß es sich möglicherweise um schwefelfreie Verbindungen handele und daß der Schwefel eine Beimischung sei.

Ein anderes Verfahren wurde von Beitler[1]) angewandt. Er unterwarf die pankreatische Verdauungsflüssigkeit der Dialyse durch Pergamentpapier und fällte das Dialysat mit Chlorwasser aus. Er war der erste, der die Resultate seiner Analysen in einer Formel auszudrücken versucht hat, und zwar ist $C_{96} H_{119} N_{21} O_{31} S$ Beitlers Formel für das Proteinochromogen (Tryptophan), und $C_{96} H_{116} Cl_3 N_{21} O_{31} S$ die Formel für das Chloroproteinochrom.

Nach Beitler ist der Halogenkörper vielleicht die Verbindung von einem Eiweißstoffe mit einer Chromogengruppe von relativ einfacher Zusammensetzung.

Kurajeff[2]) salzte die mit Brom zu fällende Flüssigkeit vorher völlig mit Ammonsulfat aus. Er unterschied drei Bromkörper: 1. einen blau-violetten Körper mit sehr hohem Bromgehalt (35 %), 2. einen in Alkalien mit roter Farbe löslichen, in Äther unlöslichen Körper mit 27 % Bromgehalt und 3. einen in Alkalien mit brauner Farbe löslichen Körper. Außerdem soll es nach ihm einen in Wasser leichter wie in Alkohol löslichen Körper geben, den er als schwarzen Körper bezeichnet hat. Der schwarze Körper

---

[1]) C. Beitler, Berichte d. D. chem. Gesellsch. **31**. 2. 1898, S. 1604.
[2]) D. Kurajeff, Ztschr. f. physiol. Chem. **26**, 501. 1898/99.

soll in Amylalkohol gänzlich unlöslich sein und durch Pergamentpapier nur langsam diffundieren. Die ersten drei Körper lösen sich in Eisessig und werden durch Wasser wieder abgeschieden; auch in Schwefelsäure lösen sie sich in dunkelbrauner Farbe; beim Hinzufügen von viel Wasser entsteht ein flockiger Niederschlag durch Abscheidung des scheinbar unveränderten Bromproduktes. Mit Nencki stimmte Kurajeff insofern überein, als auch er den Schwefel als Beimengung betrachtete.

Es ist ferner noch zu erwähnen, daß Klug[1]) aus den Produkten der Selbstverdauung des Pankreas ein amorphes Pigment (Proteinochrom) isolierte und ihm die Formel $C_4 H_8 N O_2$ gab. Dieses Produkt gab mit Chlorwasser eine Rotfärbung ähnlich der bei der Tryptophanreaktion. Es wird nach Klug nicht bei der gewöhnlichen Verdauung gebildet, sondern nur, wenn Pankreas allein verwendet wird. Er sah es als eine sekundäre Verbindung an, entstanden durch die Wirkung einer im Pankreas vorhandenen Oxydase. Die Art der Herstellung bei Klug spricht kaum dafür, daß das Produkt rein gewesen ist.

Man schien von der Lösung der Tryptophanfrage noch sehr weit entfernt zu sein, als es Hopkins und Cole[2]) gelang, die Muttersubstanz des Farbstoffs selbst kristallisiert darzustellen und als eine den Indolkern enthaltende Aminosäure aufzuklären. Die erwähnten Autoren bedienten sich einer 10 %igen Quecksilbersulfatlösung in 5 %iger Schwefelsäure zur Fällung des Tryptophans. Das dabei mit ausfallende Tyrosin wurde mit 5 %iger Schwefelsäure fortgewaschen, das Cystin fraktioniert gefällt und dadurch entfernt, und die Quecksilberverbindung des Tryptophans durch Schwefelwasserstoff zerlegt. Das auf diese Weise gewonnene Produkt stellt einen kristallinischen, auf Lackmus sauer reagierenden Körper mit dem Schmelzpunkte 273° dar. Es gibt in kleinsten Mengen die Tryptophanreaktion in exquisiter Weise, und der dabei entstehende rote Körper läßt sich durch Amylalkohol aufnehmen, wobei die Lösung den charakteristischen Absorptionsstreifen um D zeigt. Die Elementaranalyse des Tryptophans führte

---

[1]) Ferd. Klug, Pflügers Archiv **86**, 194. 1901.

[2]) F. G. Hopkins and S. W. Cole, Journal of Physiology **26**. 1901.

zu der Formel $C_{11} H_{12} N_2 O_2$ und wurde von Hopkins und Cole durch die Analyse des salzsauren Tryptophans weiter gestützt. Die erhaltenen analytischen Daten stimmten entsprechend auf die Formel $C_{11} H_{12} N_2 O_2 H Cl$.

Das Tryptophan ist optisch aktiv und zwar beträgt sein spezifisches Drehungsvermögen $[\alpha_D = -33^0]$ [1]). Die Produkte der Einwirkung von Fäulnisbakterien auf das Tryptophan gaben im Destillat die Reaktionen auf Indol und Skatol, im Rückstand sehr intensiv alle drei von E. Salkowski [2]) beschriebenen Reaktionen für Skatolkarbonsäure, welche dabei von Hopkins und Cole auch rein isoliert wurde.

Durch Einwirkung von Rauschbrandbazillen auf das Tryptophan konnten die englischen Autoren Skatolessigsäure herstellen, die Nencki früher (Sitzungsb. d. K. Akad. in Wien, 98, II. 1890) mit demselben Bakterium aus Eiweiß erhalten hatte.

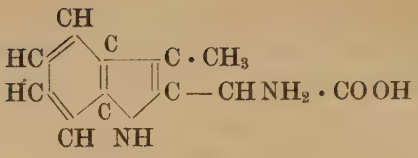
Bei der Kalischmelze erhielten Hopkins und Cole Skatol im Destillat, während Oxal-, mitunter Glyoxylsäure und Ammoniak im Rückstand nachgewiesen werden konnten. — Eine Substanz, die der Formel $C_{11} H_{12} N_2 O_2$ entspricht, den Indolkern in Molekül besitzt und zu den Produkten der Trypsinverdauung gehört, kann nach Hopkins und Cole nur eine Indolaminopropionsäure oder Skatolaminoessigsäure sein. Das Entstehen von großen Massen von Skatolessigsäure bei der Einwirkung von anaeroben Bakterien, ebenso auch wie die Bildung von viel Skatol neben Ammoniak und Oxalsäure bei Schmelzung mit Kalikarbonat schienen die genannten Autoren zu berechtigen, das Tryptophan als Skatolaminoessigsäure (I) anzusehen zu dürfen. Allein durch eine Reihe weiterer Untersuchungen gelangte A. Ellinger [3]) zu dem Schlusse, daß die Formel einer Indolaminopropionsäure wahrscheinlicher ist; welches der beiden möglichen Isomeren (II oder III) im Tryptophan vorliegt, ist noch unentschieden.

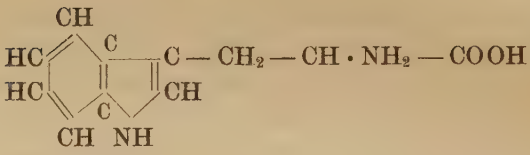
---

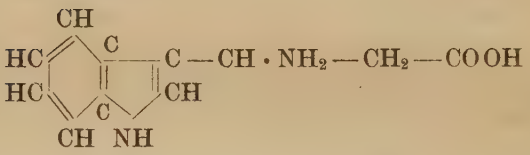
[1]) F. G. Hopkins and S. W. Cole, Journal of Physiology **29**. 1903.

[2]) Ztschr. f. physiol. Chem. **9**. 1884.

[3]) Ber. d. dtsch. chem. Ges. **39**, 2515. 1906.

I. 

II. 

III. 

Nachdem es Hopkins und Cole gelungen war, die Indolaminopropionsäure rein herzustellen, schien es aussichtsvoll, ein eingehendes Studium der Tryptophanreaktion und der dabei entstehenden Brom- und Chlorverbindungen vorzunehmen, um die mannigfach bestehenden großen Differenzen in den bisherigen Angaben aufzuklären.

Die Gewinnung des Tryptophans geschah im wesentlichen, jedoch mit kleinen Abweichungen[1]) nach der Vorschrift der englischen Autoren.

Es wurden in vier Flaschen zwei Kilogramm käuflichen Kaseins zu je 500 g verteilt, mit je 5 l Wasser versetzt, mit Ammoniak alkalisch gemacht und unter Zusetzung von Pankreatin und einer zur Verhinderung der Fäulnis ausreichenden Menge von Chloroform bei 38° vierzehn Tage lang der tryptischen Verdauung unterworfen. Die Verdauungsflüssigkeit wurde filtriert und bis etwa auf ein Viertel ihres Volumens eingeengt, und schließlich vom dabei ausge-

[1]) Es wurde Ammoniak statt Soda genommen, wie es öfters von E. Fischer für Verdauungen empfohlen ist, und vor der Fällung des Tryptophans das Tyrosin durch Kristallisation entfernt. Hierdurch kann man nicht nur die Gewinnung von Tyrosin mit der Darstellung des Tryptophans verbinden, sondern erleichtert auch die Reinigung des letzteren.

fallenen Tyrosin und einem geringen Teil des Leucins durch Filtration befreit.

Das Filtrat wurde weiter nach Hopkins und Cole behandelt. Es wurde Schwefelsäure zugesetzt und zwar bis zu einem Gehalt von 5 Volumprozent und das Tryptophan mit dem Reagens von Hopkins und Cole ausgefällt. Dieses schon oben erwähnte Reagens stellt eine 10%ige Lösung von Quecksilbersulfat in 5%iger Schwefelsäure vor. Es fällt dabei ein dunkelgelber Niederschlag aus, der aus Doppelverbindungen von Quecksilbersulfat mit Tryptophan, Tyrosin und Cystin besteht. Das an Quecksilbersulfat gebundene Tyrosin ist in 5%iger Schwefelsäure löslich. Der Niederschlag wurde demgemäß solange mit verdünnter Schwefelsäure gewaschen, bis im Waschwasser durch das Millonsche Reagenz kein Tyrosin mehr nachzuweisen war. Der Niederschlag wurde mehrmals sorgfältig mit Wasser gewaschen, dann mit Wasser angerieben und in einen Kolben gebracht. Nun geht die Zerlegung der Tryptophandoppelverbindung mit Quecksilber außerordentlich langsam vor sich, und wir fanden es zweckmäßig, durch Zusatz von Baryt bis zur schwach alkalischen Reaktion die entstehende freie H_2SO_4 abzustumpfen und dadurch die Zerlegung zu beschleunigen. Dabei wird die Flüssigkeit durch das Freiwerden von Schwefelsäure wieder sauer, sodaß alles Baryum im Niederschlage bleibt. Eine zu große Menge Barytwasser ist natürlich zu vermeiden. Es ist auch angebracht die Flüssigkeit von Zeit zu Zeit zu erwärmen, bezw. auf dem Wasserbade zu halten. Nach 24 Stunden langer Zersetzung wurde abfiltriert, der Niederschlag in einer Reibschale nochmals zerrieben, mit Wasser versetzt und wiederum 24 Stunden lang mit Schwefelwasserstoff behandelt, dann wie zuvor filtriert und mit Wasser solange gewaschen, bis sich im Waschwasser durch Zusatz von Brom keine Rötung mehr erzeugen ließ. Das Filtrat wurde vom Schwefelwasserstoff durch Erhitzen befreit, wieder mit Schwefelsäure schwach angesäuert und einer fraktionierten Fällung mit Quecksilbersulfatlösung unterworfen. Es genügen jetzt meist 20 bis 25 ccm der Lösung, um die Hauptmenge des Cystins, aber noch kein Tryptophan auszufällen, wenn die Menge verdauten Kaseins 2 kg betrug. Die Cystinverbindung fällt dabei als flockiger, brauner Niederschlag und ist durch Filtration zu beseitigen. Nun

wird erst das Tryptophan ausgefällt, und zwar entsteht bei dieser zweiten Fällung ein hellgelber Niederschlag, der wie zuvor gewaschen und mit Schwefelwasserstoff zersetzt wurde. Das von Schwefelwasserstoff befreite, schwefelsäurehaltige Filtrat wird bei Hopkins und Cole quantitativ mit Barythydrat von der Schwefelsäure befreit. Diese Prozedur ist lästig, und Neuberg[1]) hat daher ein weniger umständliches Verfahren vorgeschlagen. Bei diesem wird das noch Schwefelsäure enthaltende Filtrat des mit Schwefelwasserstoff zerlegten zweiten Quecksilberniederschlages mit 100 g Bleikarbonat versetzt, mit Ammoniak alkalisch gemacht und erhitzt resp. durch Einleiten von Dampf erwärmt. Außer seiner Einfachheit hat dieses Verfahren den Vorzug, daß die stets noch vorhandenen organischen Schwefelverbindungen dabei ausgefällt werden. Nach einer Stunde wird die Flüssigkeit heiß filtriert und vom gelösten Blei mittels Schwefelwasserstoff befreit und wiederum filtriert. Das Filtrat wurde auf dem Wasserbade eingeengt. Nach genügender Konzentration erstarrt dabei die Flüssigkeit fast vollständig zu einem Brei von Kristallen der Indolaminopropionsäure. Von der geringen Mutterlauge durch Absaugen befreit, wurde das Tryptophan in Wasser gelöst und mit Knochenkohle in der Siedehitze entfärbt, dann noch zweimal aus Wasser umkristallisiert und mit Alkohol und Äther gewaschen. Die Ausbeute betrug 7 g.

Es wurden noch 2 kg Kasein auf dieselbe Weise verarbeitet und 9 g Tryptophan erhalten.

Auch Fibrin wurde zur Herstellung des Tryptophans verwendet. 3 kg feuchten Fibrins, etwa 600 g Trockensubstanz entsprechend, wurden verdaut und in analoger Weise behandelt. Die Ausbeute betrug 8 g. Aus den gesamten Mutterlaugen erhielten wir durch Verarbeitung nach den Angaben von Hopkin und Cole noch kleine Mengen Tryptophan.

Das erhaltene Tryptophan bildet weiße Kristalle, hat den richtigen Schmelzpunkt (273°) und gibt alle charakteristischen Reaktionen.

[1]) C. Neuberg, Zur Kenntnis des Tryptophans. Charité-Annalen, 30. Jahrgang. 1906.

Die so hergestellte Indolaminopropionsäure zeigte deutliche Linksdrehung der Polarisationsebene. Was das spezifische Drehungsvermögen anbetrifft, so beträgt es nach den englischen Autoren $[\alpha_D] = -33^0$. Dabei ist nicht angegeben, auf welche Weise es festgestellt ist, ob in neutraler, salzsaurer oder alkalischer Lösung. Das Tryptophan ist in reinem Zustande nur außerordentlich schwer löslich in Wasser. Schon aus einer $^1/_4$ %igen Lösung kristallisiert es beim Erkalten aus. Das in wässeriger Lösung bestimmte Drehungsvermögen des aus den ersten 2 kg Kasein hergestellten Tryptophans ergab $[\alpha_D] = -7{,}8^0$. Möglicherweise ist beim Behandeln des Rohtryptophans mit Bleikarbonat ein Teil der Indolaminopropionsäure razemisiert.

Auch das aus andern Kaseinproben hergestellte Tryptophan wurde auf sein Drehungsvermögen geprüft, auch in alkalischer Lösung. 0,3 Tryptophan wurden in 10 ccm $^1/_2$-normaler Natriumhydratlösung aufgelöst. Das spezifische Drehungsvermögen ergab sich dabei zu $[\alpha_D] = -13{,}7^0$.

Weiter haben wir festgestellt, daß sich die N-Menge der beiden im Tryptophan enthaltenen Stickstoffatome nach Kjeldahl bestimmen läßt. 0,2000 g zweimal umkristallisierten Tryptophans mit Schwefelsäure und Quecksilberoxyd nach Kjeldahl behandelt gaben eine Menge Ammoniak, welche 3,8 ccm $^1/_2$-normaler Schwefelsäure binden konnte. Dieses entspricht 13,30 % N. 0,1954 mit Schwefelsäure und Kupfersulfat nach Kjeldahl behandelt, ergaben eine 3,7 ccm $^1/_2$-normaler Schwefelsäure entsprechende Menge Ammoniaks. Das entspricht 13,31 % N.

Dieses Verhalten ist insofern von Wichtigkeit, als in letzter Zeit mehrfach die Behauptung aufgestellt worden ist, daß sich der Stickstoff der Proteinstoffe und mancher ihrer Abkömmlinge nicht nach Kjeldahl ermitteln lasse. Ist diese Angabe richtig, so mußte man in erster Linie an die ringförmigen N-haltigen Bausteine des Eiweißmoleküls denken, da ja von andern heterozyklischen Substanzen (z. B. Pyridin, Chinolin usw.) bekannt ist, daß sie ihren Stickstoff nicht bei Behandlung mit konzentrierter Schwefelsäure als Ammonsulfat abgeben.

Heterozyklische Eiweißspaltungsprodukte kennen wir bis jetzt zwei resp. drei, eben das Tryptophan, die Pyrrolidinkarbonsäure (Prolin) und die Oxypyrrolidinkarbonsäure (Oxyprolin). Die beiden erstgenannten kommen, soweit bisher bekannt, häufig in nennenswerten Mengen unter den Bausteinen der Eiweißstoffe vor.

Obgleich im Tryptophan [1]) das ungesättigte Ringsystem des Indols mit dem Pyrrolringe vorliegt, läßt sich, wie aus den mitgeteilten Daten hervorgeht, sein Stickstoff quantitativ nach Kjeldahl ermitteln, sowohl wenn die Verbrennung mit Kupfersulfat als auch mit Quecksilberoxyd als Katalysator ausgeführt wird.

Berechnet:	Gefunden:
13,72 % N.	13,31 % N.

Ganz ebenso verhält sich das Prolin.

1. 0,1440 g l-α-Pyrrolidinkarbonsäure (über P_2O_5 bei 40° getrocknet) verbrauchten 12,8 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4 = 0,0179 g N (unter Zusatz von HgO verbrannt).

$C_5H_9NO_2$: Ber. N = 12,17 %; Gef. N = 12,41 %.

2. 0,2019 g racem. α-Pyrrolidinkarbonsaures Kupfer (vorher bei 100° entwässert), verbrauchten 13,7 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4 = 0,0192 g N (direkt mit H_2SO_4 verbrannt).

$(C_5H_8NO_2)_2$ Cu: Ber. N = 9,62 %; Gef. N = 9,52 %.

Die Tryptophanreaktion.

Als Tryptophanreaktion bezeichnet man, wie schon oben erwähnt, das Entstehen einer roten Verfärbung bezw. eines roten Niederschlages bei der Einwirkung von Brom- oder Chlorwasser auf Indolaminopropionsäurelösungen. Da wir von reinem Ausgangsmaterial, der isolierten Indolaminopropionsäure, ausgingen, so konnten wir den Verlauf der Reaktion eingehender studieren. Die früheren Autoren, die es mit tryptophanhaltigen Verdauungsgemischen zu tun hatten, waren nicht imstande, irgend welche

[1]) Vergl. dagegen das abweichende Verhalten seiner Halogensubstitutionsprodukte (Seite 22 u. 23), in denen der Stickstoff nicht nach Kjeldahl ermittelt werden kann.

quantitative Normen anzugeben. In einem stimmen aber alle seit Tiedemann und Gmelin überein, daß durch einen Überschuß von Halogen der rote Körper zerstört wird.

Die Tryptophanreaktion verläuft mit reinem Material folgendermaßen. Wenn man zu einer Indolaminopropionsäurelösung Brom- oder Chlorwasser zusetzt, so bildet sich zunächst je nach der Konzentration eine rote Lösung oder ein roter Niederschlag, die bei weiterem Zusatz von Halogenwasser in Gelb übergehen. Das Verhältnis des gelben zum roten Körper war bisher unbekannt. Wir haben darüber zunächst folgendes ermittelt. Fügt man zu einer wässerigen Suspension des gelben Körpers eine Lösung von Indolaminopropionsäure (Tryptophan), so verwandelt er sich in den roten zurück, während ein noch so großer Überschuß an Tryptophan den fertigen roten Körper nicht verändert.

Wir haben es demnach mit zwei Körpern zu tun, von denen der rote bei geringerem Zusatz von Halogen entsteht, der gelbe dagegen bei einem Überschuß sich bildet. Dabei läßt sich der rote Körper durch weiteren Zusatz von Halogen in den gelben umwandeln, der gelbe dagegen geht bei Tryptophanüberschuß in den roten über. Es war von vornherein anzunehmen, daß es sich dabei um zwei verschiedene Halogenverbindungen der Indolaminopropionsäure handelt, von denen die gelbe mehr Brom enthält, daß der gelbe Körper auf jeden Fall aus dem roten Körper besteht plus einer neuen Menge Halogen und daß dieser Mehrgehalt von Halogen an den gelben Körper relativ locker gebunden ist und leicht abgegeben werden kann.

Die typische Tryptophanreaktion, wie wir sie hier beschrieben haben, verläuft so in neutraler Lösung. Von Interesse ist, den Verlauf der Reaktion in alkalischer und saurer Lösung zu studieren, weil man es häufig mit alkalisch reagierenden Verdauungsflüssigkeiten zu tun hat, wenn man in praxi die Tryptophanreaktion ausführt. Wie erwähnt, widersprechen sich die Angaben der Autoren über die für den positiven Ausfall der Tryptophanprobe notwendige Reaktion der Flüssigkeit.

Wenn man die Probe in Natriumhydratlösung anstellen will, so bedarf man einer viel größeren Menge Halogens, was schon deshalb verständlich ist, weil sich dabei auch Natriumhypobromit

bezw. Hypochlorit bildet. Erst nach sehr reichlichem Zusatz von Halogen nimmt die Lösung eine kirschrote Farbe an, ohne sich aber dabei zu trüben. Die Verfärbung geht nur zum Teil in Amylalkohol über; völlig kann hier die rote Substanz nicht extrahiert werden. Ebenso verläuft die Probe, wenn sie in ammoniakalischer Lösung ausgeführt wird oder wenn die Lösung natriumkarbonathaltig ist. Essigsäure und verdünnte Schwefelsäure sind ohne Einfluß auf die Farbenreaktion.

Anders verhalten sich die Halogenwasserstoffsäuren. Gibt man zu einer in überschüssiger Bromwasserstoffsäure aufgelösten Menge Tryptophan Bromwasser hinzu, so entsteht keine rote Färbung, und schließlich fällt spärlich der gelbe Körper aus.

Es sei hinzugefügt, daß das Jod bei der Anstellung der Tryptophanreaktion eigentlich nicht in Betracht kommt, da wegen der Eigenfarbe des Jods die Entscheidung schwierig ist, ob es überhaupt eine dem roten Chlor- oder Bromkörper analoge Substanz erzeugt. Es läßt sich aber Jod, und zwar ziemlich leicht, in die Indolaminoessigsäure einführen [1]), so daß außer dem aromatischen Komplex auch der Indolkern der Proteïne als Träger des Jods in den Jodeiweißkörpern in Betracht kommt.

Nachdem der Verlauf der Tryptophanreaktion klar gestellt worden ist, konnten die zugrunde liegenden Vorgänge von der quantitativen Seite verfolgt werden.

Es wurde zu diesem Zwecke eine titrierte Bromlösung bereitet und zwar so, daß 2 g Brom in 250 ccm Bromkaliumlösung gelöst wurden. Die Lösung war also eine $^1/_{10}$-normale Bromlösung.

0,204 g Indolaminopropionsäure dem Molekulargewichte (204) entsprechend wurden in 50 ccm Wasser gelöst und in 10 Reagenzgläser davon je 5 ccm verteilt. In jedem Reagenzglase waren 0,0204 Tryptophan vorhanden. Nun wurde die Tryptophanlösung mit Brombromkaliumlösung titriert. Zum ersten Reagenzglase wurden 1 ccm Bromlösung zugesetzt, zum zweiten 2 ccm usw. Dabei konnte festgestellt werden, daß die Rotfärbung vom ersten Reagenzglase ab an Intensität zunahm, im Reagenzglase Nr. 4, wo die Menge zugesetzter Bromlösung 4 ccm betrug, ihr deutliches

[1]) Hierüber soll später berichtet werden.

Maximum erreichte, um bei Zusatz von noch mehr Brom in den nächsten Reagenzgläsern weniger deutlich rot zu werden und schließlich über schmutzig-violett in gelb überzugehen.

Es tritt also ein Maximum der Färbung ein, wenn je 1 Molekül Tryptophan mit 4 Atomen Brom versetzt wird. Wie weiter gezeigt wird, sind die hier sich abspielenden Vorgänge komplizierter, als es vielleicht auf den ersten Blick scheinen möchte. Es wurde dabei aber sichergestellt, daß bei Versetzung von einem Molekül Tryptophan mit vier Atomen Brom sich allein der rote Körper bildet. Nahm man zur Herstellung der roten Verbindung eine Spur weniger Brom als 4 Atomen entspricht, so konnte konstatiert werden, daß nach Filtration der Flüssigkeit und Befreiung hiermit vom roten Körper das Filtrat auf Zusatz von neuem Bromwasser sich noch schwach rosa färbte, um dann mit noch mehr Brom reichlich den gelben Körper zu bilden. Dieses war ein Beweis dafür, daß bei dem Verfahren der rote Körper ohne Beimischung des gelben erhalten wird.

Um die Verbindung in größerer Menge herzustellen, wurden 2 g Indolaminopropionsäure in Wasser unter Erwärmen aufgelöst, die Lösung filtriert, abgekühlt und mit 3 g in Bromkaliumlösung gelöstem Brom versetzt. Nach zwölf Stunden wurde die Flüssigkeit filtriert, der Niederschlag auf dem Filter so lange mit kaltem Wasser gewaschen, bis im Waschwasser durch Kobaltinatriumnitrit kein Kalium mehr nachzuweisen war. Der so erhaltene rote Körper wurde in vacuo bei 50° bis zu einem konstanten Gewicht gebracht. Die Ausbeute betrug 0,45 g. Das Filtrat wurde eingeengt. Nach Zusatz von Ammoniak fiel aus dem stark eingeengten Filtrat ein Niederschlag aus, der aus Tryptophan bestand. Ein Teil des Filtrats mit Silbernitrat versetzt, gab einen weißen in Ammoniak schwer löslichen Niederschlag von Silberbromid. — Es konnte sich demnach im Filtrat vom roten Körper nur um das bromwasserstoffsaure Salz der Indolaminopropionsäure handeln.

Es wurden ferner 6 g Tryptophan mit 9 g Brom in Bromkaliumlösung versetzt, der rote Körper, dessen Menge 1,3 betrug, auf oben beschriebene Weise behandelt, das Filtrat aber mit einem Überschuß von Brombromkaliumlösung versetzt, so daß die Flüssigkeit deutlich nach Brom roch; nach zwölf Stunden wurde der da-

bei entstandene gelbe Körper von der Flüssigkeit durch Filtrieren befreit, mit Wasser gewaschen und in vacuo zum konstanten Gewichte gebracht. Die Ausbeute betrug 1,77 g.

Je nach Bedarf wurden auch weiter der rote und gelbe Körper auf die beschriebene Weise hergestellt.

Das Filtrat vom gelben Körper wurde bis zur Trockne auf dem Wasserbade eingedampft. Der Rückstand, der zum größten Teil aus Bromkalium bestand, wurde kalt mit Alkohol-Äther ausgezogen. Nachdem der Auszug durch gelindes Erwärmen vom Alkohol und Äther befreit worden, bildete er eine braunschwarze Masse, die in Wasser zum größten Teil löslich war. Es entstehen also bei der Tryptophanreaktion ein roter und ein gelber Körper, die in Wasser nur sehr schwer löslich sind, sowie eine braunschwarze, halbfeste Substanz, die in Wasser löslich ist, daher aus der Lösung nicht ausfällt und auch kein besonderes Interesse beansprucht.

Der rote Bromkörper.

Die rote Bromverbindung fällt als feinkörniger, auch unter dem Mikroskop amorph aussehender Niederschlag aus, der sich mit Amylalkohol und Äther extrahieren läßt. Der Amylalkoholauszug zeigt ein Absorptionsband um D. In Äther löst sich der rote Körper etwas schwerer mit einer prachtvollen rot-violetten Farbe. Auch in Alkohol ist er löslich. Alkalien lösen den roten Körper mit kirschroter Farbe; Schwefelsäure löst ihn auch. In Wasser suspendiert und mit Silbernitrat versetzt, verliert der Körper seine Farbe und gibt einen Teil seines Broms an das Silber ab.

Ein scharfer Schmelzpunkt konnte nicht festgestellt werden. Die Verbindung zersetzt sich zwischen 270° und 280°.

Der rote Bromkörper ist analysiert worden. Die Bestimmung des Broms wurde nach Carius ausgeführt, die Stickstoffbestimmung nach Dumas und die Ermittelung von Kohlenstoff und Wasserstoff nach Liebig; dabei wurde die Verbrennung mit Bleichromat vorgenommen und vorn in das Verbrennungsrohr eine reduzierte Kupferspirale eingeschaltet.

Bei der Brombestimmung nach Carius wurde das Schießrohr bis auf 300° erhitzt.

0,1315 Subst. gaben 0,0876 Silberbromid, gef. 28,28% Brom.
0,1340 Subst. gaben 0,0883 Silberbromid, gef. 28,06% Brom.

Stickstoffbestimmungen:

0,1617 Substanz gaben bei 25° und 761 mm Druck 14,1 ccm feuchten Stickstoff, gefunden 9,71% N.
0,1520 Substanz gaben bei 25° und 758 mm Druck 13,4 ccm feuchten Stickstoff, gefunden 9,76% N.

Kohlenstoff- und Wasserstoffbestimmungen:

0,1222 Substanz gaben 0,0462 H_2O und 0,2074 CO_2, gefunden 4,20% H und 46,28% C.
0,1471 Substanz gaben 0,0545 H_2O und 0,2506 CO_2, gefunden 4,11% H und 46,35% C.

Die angeführten Analysen stimmen ausgezeichnet auf ein Monobromsubstitutionsprodukt der Indolaminopropionsäure, auf $C_{11}H_{11}N_2O_2Br$.

D. Kurajeff (a. a. O.), der in Hofmeisters Laboratorium vor unseren Untersuchungen die Reinigung des roten Bromkörpers wohl am weitesten getrieben hat, glaubte, mindestens zwei rote Verbindungen unterscheiden zu sollen. Er fand die Zusammensetzung:

a) C = 49,71 — 50,07%;
H = 3,25 — 3,74 „;
Br = 24,89 — 27,46 „;
N = 10,67 „;
S = 1,27 „; ferner
b) Br = 32,12 — 34,54 „.

Wie ersichtlich, entfernen sich diese Werte noch recht beträchtlich von der Zusammensetzung der reinen Substanz, wie wir sie dargestellt haben. — Da übrigens die früheren Autoren den Stickstoff in den Tryptophanhalogenverbindungen fast immer nach Kjeldahl bestimmten, mußten sie zu falschen Formeln gelangen (siehe S. 22 u. 23!).

Auch die Zusammensetzung einer Verbindung, die in irgend einer Weise etwa HBr angelagert hätte und die Formel $C_{11}H_{13}N_2O_2Br$ besäße, würde mit den Ergebnissen der Analysen übereinstimmen. Allein die Bindung des Broms in dieser Substanz ist im Gegensatz

zu dem später beschriebenen Tribromkörper so fest, daß wohl eine Substitution unter Bildung von Monobromindolaminopropionsäure stattgefunden hat.

Berechnet für $C_{11}H_{11}N_2O_2Br$:		Gefunden:	
Br	28,20 %	Br	28,17 %
N	9,89 „	N	9,74 „
H	3,92 „	H	4,15 „
C	46,64 „	C	46,32 „

Mit Jodkaliumlösung erhitzt, gibt das Monobromtryptophan sein Brom nicht ab oder macht wenigstens kein Jod frei.

Es ist noch auf den Umstand aufmerksam zu machen, daß sich der Stickstoff im roten Körper nicht völlig nach Kjeldahl bestimmen läßt.

0,1379 Substanz nach Kjeldahl behandelt (verbrannt mit $CuSO_4$), ergaben nur 7,73 % Stickstoff,

0,1194 Substanz nach Kjeldahl behandelt (verbrannt mit HgO), ergaben nur 7,39 % Stickstoff.

Es wurde der Versuch gemacht, das Monobromtryptophan mittels Zinkstaub und Essigsäure zu reduzieren, jedoch ließ sich dabei keine freie Indolaminopropionsäure zurückgewinnen. Die entstehende Flüssigkeit gibt nach Entfernung des Zinks mit Schwefelwasserstoff eine sehr schwache Glyoxylreaktion und einen hellgelben Niederschlag mit Bromwasser. Der Versuch wurde nicht weiter verfolgt.

Über den Ort, an dem das Brom eintritt, läßt sich mit Sicherheit nichts aussagen. Die große Festigkeit, mit der das Halogen haftet, macht einen Eintritt in den Ring wahrscheinlich. Ob aber der Pyrrol- oder der Benzolring Träger des Broms ist, muß vorläufig unentschieden bleiben. Beide Möglichkeiten bestehen, da sowohl die aromatischen Aminosäuren wie die Pyrrolderivate mit großer Leichtigkeit Halogen aufnehmen; vielleicht spräche die erwähnte Tatsache, daß sich der Stickstoff im Monobromtryptophan nicht nach Kjeldahl bestimmen läßt, für den Eintritt des Halogens in den Pyrrolrest.

Ein Eintritt des Halogens in die Seitenkette ist nach den bisherigen Erfahrungen nicht wahrscheinlich.

Der gelbe Bromkörper.

Wie oben erwähnt, entsteht bei Einwirkung eines Überschusses von Bromwasser auf Indolaminopropionsäurelösungen ein gelber, flockiger Niederschlag, der sich im Gegensatz zu dem Monobromtryptophan rasch zu Boden setzt. Auch dieser Niederschlag ist amorph, selbst unter dem Mikroskop betrachtet. Der gelbe Körper kann auch abgenutscht werden, während der rote dabei durch das Filtrierpapier geht. Die gelbe Bromverbindung muß in vacuo bei Zimmertemperatur getrocknet werden, da sie sich bei höherer Temperatur leicht bräunt. Dieselbe Erscheinung tritt ein, wenn das Ausgangsmaterial nicht ganz rein war.

Der gelbe Bromkörper ist weder in Amylalkohol noch Äther löslich, sehr schwer löslich in Äthylalkohol, ferner löst er sich, wenn auch schwer, in Alkalien. Er hat keinen eigentlichen Schmelzpunkt, fängt an, sich schon bei 75° zu zersetzen. Die gelbe Verbindung wurde nach denselben Methoden wie die rote analysiert, und zwar ergaben die Bestimmungen:

Brombestimmungen nach Carius:

0,1528 Subst. gaben 0,1950 Silberbromid, gef. 54,22% Br.
0,1452 Subst. gaben 0,1838 Silberbromid, gef. 53,88% Br.

Stickstoffbestimmungen nach Dumas:

0,1523 Substanz bei 23°, Druck 757 mm, gaben 8,7 ccm feuchten N, gefunden 6,37% N.
0,1716 Substanz bei 24°, Druck 758 mm, gaben 9,8 ccm feuchten N, gefunden 6,39% N.

Kohlenstoff- und Wasserstoffbestimmung:

0,1942 Substanz gaben 0,0378 H_2O und 0,2115 CO_2, gefunden 2,40% H und 29,70% C.

Die erhaltenen Daten zeigen, daß 3 Bromatome in das Tryptophanmolekül eingetreten sind. Auch hier läßt sich nicht der gesamte Stickstoffgehalt nach Kjeldahl bestimmen. Es konnten nach Kjeldahl nur 4,86% und 5,15% Stickstoff nachgewiesen werden. Wie schon früher erwähnt, entsteht der gelbe Körper bei überschüssigem Bromzusatz unter intermediärer Bildung der roten Substanz; er enthält, wie die Analysen lehren, mehr Halogen. Es

ist nun interessant und wichtig für die Frage nach der Bindung der mehr eingetretenen Bromatome, daß sich der fertige gelbe Körper wieder in den roten überführen läßt.

Solange er feucht ist, wird er in wässeriger Suspension durch Zusatz von Indolaminopropionsäurelösung fast augenblicklich in den typischen roten Körper zurückverwandelt; und dieselbe Reaktion tritt, wenn auch langsamer und weniger vollständig, mit der getrockneten Substanz ein.

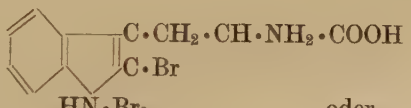
Daraus ist der Schluß zu ziehen, daß in dem gelben Körper ein Additionsprodukt von Brom an den roten Körper vorliegt. Über die Art der Bindung gibt auch das Verhalten zu Jodkalium Aufschluß.

Wenn man in einem Reagenzglase den gelben Körper mit Jodkaliumlösung versetzt, so wird Jod frei, was mittels Stärkelösung leicht festzustellen ist. Es wurde der Versuch gemacht zu ermitteln, wieviel Atome Brom sich dabei abspalten. Von vornherein konnte man auf eine sehr große Genauigkeit des Versuches nicht rechnen, weil bei der absoluten Unlöslichkeit der gelben Substanz die Umsetzung schwerlich vollständig verlaufen wird. Immerhin zeigten die Analysen, daß mehr als ein Atom Brom, aber weniger als zwei aus dem Jodkalium die äquivalente Menge Jod in Freiheit setzen. Es wurden z. B. 0,1479 Substanz in ein Becherglas gebracht, mit einem Überschuß schwacher Jodkaliumlösung und 15,0 ccm $^1/_{10}$-normaler Natriumthiosulfatlösung versetzt und vorsichtig bei 37° 12 Stunden lang digeriert. Die erkaltete Flüssigkeit wurde dann mit $^1/_{10}$-normaler Jodlösung zurücktitriert, wobei 7,7 ccm Lösung verbraucht worden sind. 7,3 ccm Natriumthiosulfatlösung sind also durch das frei gewordene Jod gebunden worden. Dieses entspricht 0,0584 abgespaltenem Brom. Es geht daraus hervor, daß jedenfalls mehr als ein Atom Brom bei dem beschriebenen Verfahren losgelöst wird; zwei abgespaltene Atome würden 0,0821 Brom entsprechen. Es wird also mehr als die Hälfte der theoretischen Menge dabei abgespalten. Daß dabei der gelbe Körper in den roten übergeht, konnte auf folgende Weise gezeigt werden. Eine kleine Menge der gelben Bromverbindung wurde wie zuvor mit Jodkalium und Natriumthiosulfat versetzt und eine halbe Stunde lang erwärmt. Die abgekühlte Flüssigkeit

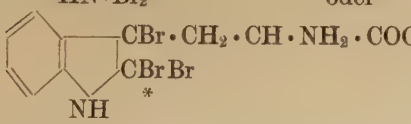
wurde mit Amylalkohol extrahiert. Der Amylalkoholauszug, der zuerst trüb und gelblich aussah, wurde stehen gelassen. Nach einiger Zeit hatte sich der noch nicht umgesetzte, in Amylalkohol unlösliche gelbe Körper am Boden abgeschieden, und der Amylalkoholauszug zeigte die prachtvolle rote Farbe und das charakteristische Absorptionsband bei D, die für das Monobromtryptophan charakteristisch sind.

Es wurde auch der Versuch gemacht, die gelbe Bromverbindung mit Zinkstaub und Essigsäure zu reduzieren. Dabei entsteht nach Entfernung des Zinks im Filtrat vom ZnS ein Produkt, welches mit Brom wieder einen gelben, flockigen Niederschlag gibt. Schüttelt man aber die reduzierte Flüssigkeit ohne sie zu filtrieren mit Amylalkohol aus, so nimmt der Amylalkoholauszug die für das Monobromtryptophan charakteristische schön rote Farbe an mit dem Absorptionsstreifen um D.

Der Umstand, daß sich der gelbe Körper verhältnismäßig leicht und auf verschiedenen Wegen in den roten umwandeln läßt, macht es wahrscheinlich, daß zwei Atome Brom anders gebunden sind als das dritte. Die leichte Abspaltbarkeit läßt an eine perbromidartige Bindung denken, aber auch ein Eintritt in den Pyrrolring und die Umwandlung einer doppelten Bindung in eine einfache ist nicht unmöglich, zumal gerade bei dem Pyrrol ein ausgesprochenes Bindungsvermögen für Halogen besteht. Man muß die Formelbilder

I. 

oder

II. 

ferner solche, in denen das mit einem Stern bezeichnete Bromatom im Benzol- statt im Pyrrolringe sitzt, in Betracht ziehen.

Tatsächlich stimmen die oben angegebenen Analysen außerordentlich gut auf Monobromindolaminopropionsäuredibromid.

Berechnet für $C_{11}H_{11}N_2O_2Br \cdot Br_2$:		Gefunden (im Mittel):	
Br	54,13 %	Br	54,05 %
N	6,32 „	N	6,38 „
H	2,47 „	H	2,40 „
C	29,79 „	C	29,70 „

Die bei der Darstellung des gelben Körpers vom Niederschlage abfiltrierte Flüssigkeit hat nach Austreibung des freien Broms durch schwache Erwärmung eine gelbliche Farbe, die vielleicht von Produkten einer tiefergehenden Einwirkung des Halogens auf Tryptophan herrührt. Sie enthielt viel Bromwasserstoffsäure. Das ist übrigens ein Grund, warum merkwürdiger Weise eine quantitative Umwandlung von Indolaminopropionsäure in den roten oder gelben Körper nicht zu erreichen ist. Denn bromwasserstoffsaures Tryptophan, das sich bei der Substitution eines Kernwasserstoffes durch Brom (roter Körper) sofort aus einem Teil des Ausgangsmaterials bildet, vermag, wie schon früher auseinandergesetzt wurde, nicht in den roten Körper überzugehen. Bei höherem Gehalt an Bromwasserstoff scheinen die Verhältnisse ebenfalls für den gelben Körper ähnlich zu liegen. Dieser Umstand gibt wohl auch die Erklärung für die überraschende Tatsache, daß das Maximum der Rotfärbung und damit die schönste Tryptophanreaktion eintritt, wenn 4 Atome Brom auf 1 Molekül Indolaminopropionsäure kommen, obgleich das isolierte rote Reaktionsprodukt nur 1 Atom Br im Molekül enthält. Man muß sich vorstellen, daß 1 Atom Brom eintritt, ein weiteres Bromwasserstoff bildet, während die beiden anderen ein lösliches, noch unbekanntes Additionsprodukt vielleicht von Tryptophanbromhydrat bilden oder auch oxydierend wirken.

$$C_{11}H_{12}N_2O_2 + 4\,Br = C_{11}H_{11}Br_1N_2O_2 + HBr + 2\,Br$$

Die Chlorverbindungen.

Aus den Angaben und mitgeteilten Analysen der früheren Autoren geht keineswegs hervor, daß die Chlorverbindungen des Tryptophans den Bromverbindungen analog konstituiert sind. Kurajeff, der sich zuletzt mit dieser Frage beschäftigt hat

(a. a. O.), erörtert vielmehr in Hinblick auf die gleichzeitig erschienenen Untersuchungen Breitlers (a. a. O.) aus Nenckis Laboratorium die Möglichkeit, daß Chlor- und Bromverbindungen von verschiedenen Chromogenen abstammen. Trotzdem lag uns von vornherein die Annahme nahe, daß sich die Chlorverbindungen des Tryptophans den Bromverbindungen ganz analog verhalten und entsprechend zusammengesetzt sind. Daß bei der Einwirkung von Chlorwasser auf Indolaminopropionsäure ebenfalls zwei Körper entstehen, ist schon erwähnt worden. Auch hier mußte das Optimum der Reaktion ausfindig gemacht werden. Es wurde Chlorwasser bereitet und dessen Stärke jodometrisch festgestellt; es enthielt in 1 ccm 0,005467 Cl. Es wurden weiter 0,102 Tryptophan in 25 ccm Wasser gelöst. Je 5 ccm dieser Lösung in Reagenzgläser gebracht und mit Chlorwasser versetzt, gaben die intensivste Färbung, wenn 2,5 ccm Chlorwasser zugefügt waren. Wurden 5 ccm Tryptophanlösung mit 2 ccm Chlorwasser versetzt und filtriert, so konnte im Filtrat noch eine Zunahme der Rotfärbung durch weiteren Zusatz von Chlor festgestellt werden. 3 ccm Chlorwasser erzeugten bereits einen Niederschlag von schmutziger Farbe, welche von der Beimischung des dabei entstehenden gelben Körpers herrührt. Die zum Eintritt der intensivsten Färbung nötige Menge Chlors entspricht ziemlich genau 4 Atomen Chlor auf je 1 Molekül Tryptophan.

Zur Herstellung des roten Chlorkörpers wurden 2,5 Tryptophan in Wasser gelöst, filtriert und mit 250 ccm des erwähnten Chlorwassers versetzt.

Nach 12 Stunden wurde der dabei entstandene, sich nur sehr langsam absetzende rote Niederschlag auf ein Filter gebracht, gewaschen und bei 50° in vacuo bis zum konstanten Gewichte getrocknet. Die

rote Chlorverbindung

fällt als ein sehr feinkörniger, auch unter dem Mikroskop amorpher Niederschlag aus. Ihr Verhalten gegen die verschiedenen Solventien ist vollkommen analog dem vom Monobromtryptophan. Der Zersetzungspunkt liegt gegen 280°.

Wir begnügten uns mit der Bestimmung von Chlor nach Carius und von Stickstoff nach Dumas.

0,1352 gaben 0,0801 Ag Cl, gefunden 14,65 % Cl,
0,1563 „ bei 24 ° und 756 mm Druck 16,4 ccm feuchten Stickstoff, gefunden 11,64 % N.

Berechnet für $C_{11} H_{11} N_2 O_2 Cl$:		Gefunden:	
Cl	14,88 %	Cl	14,65 %
N	11,74 „	N	11,64 „

Auch hier stimmen die Analysen auf eine Monohalogenverbindung des Tryptophans, auf Monochlorindolaminopropionsäure. Das Halogen ist fest an das Molekül gebunden und macht kein Jod aus Jodkaliumlösung selbst beim Erwärmen frei.

Die

gelbe Chlorverbindung

verhält sich ihrerseits dem Monobromtryptophandibromid vollkommen analog. Sie fällt als flockiger, sich rasch zu Boden setzender amorpher Niederschlag aus, wenn ein Überschuß an Chlor angewendet wird. Doch ist hier ein zu langes Stehen des ausgefallenen Niederschlages in Berührung mit Chlorwasser zu vermeiden; denn sonst nimmt der Niederschlag schon nach ein paar Stunden eine mehr bräunliche Farbe an. Daher wurde die frisch ausgefällte gelbe Chlorverbindung, nachdem sie sich abgesetzt hatte, sogleich auf ein Filter gebracht, mit Wasser sorgfältig gewaschen und in vacuo bis zum konstanten Gewicht getrocknet.

Die gelbe Chlorverbindung gleicht im Verhalten zu Solventien der entsprechenden Bromverbindung. Der Zersetzungspunkt liegt bei etwa 100 °.

Die Analysen ergaben folgendes:
0,1448 g ergaben 0,2003 Ag Cl;
0,1894 g ergaben bei 23 ° und 756 mm Druck 15,5 ccm feuchten Stickstoff.

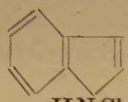
Berechnet für $C_{11} H_{11} N_2 O_2 Cl_3$:		Gefunden:	
Cl	34,41 %	Cl	34,20 %
N	9,04 „	N	9,13 „

Hier stimmen die Analysen ebenfalls auf eine 3 Halogenatome enthaltende Indolaminopropionsäureverbindung. Mit Jodkaliumlösung versetzt, gibt die Verbindung Chlor ab und macht Jod frei. Um die Menge des sich dabei abspaltenden Chlors möglichst ge-

nau festzustellen, wurde wieder der Titrationsversuch vorgenommen, der ein ähnliches Resultat wie bei dem gelben Bromkörper ergab.

Die Verbindung ist deshalb als Monochlortryptophandichlorid zu bezeichnen.

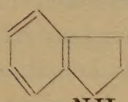
Dem Monobromindolaminopropionsäuredibromid analoge Formelbilder kommen auch hier in Betracht, z. B.:



$C \cdot CH_2 \cdot CH \cdot NH_2 \cdot COOH$

CCl

$HNCl_2$ oder



$CCl \cdot CH_2 \cdot CH \cdot NH_2 \cdot COOH$

CCl_2

NH usw.

Zusammenfassung.

Die Resultate der vorliegenden Untersuchungen lassen sich ungefähr folgendermaßen zusammenfassen.

1. Die reine Indolaminopropionsäure $C_{11}H_{12}N_2O_2$ (Tryptophan) wird bei vorsichtigem Zusatz von Chlor- oder Brom-Wasser rot-violett gefärbt, und zwar tritt das Maximum der Färbung ein, wenn der Gehalt an Halogen in der Lösung 4 Atome Chlor bezw. Brom auf 1 Molekül Tryptophan beträgt.

2. Diese als roter Körper bezeichnete Substanz fällt bei stärkerer Konzentration aus und bildet ein feinkörniges amorphes Pulver, das im trocknen Zustande starken schwarzen Oberflächenschimmer zeigt. Die Verbindung ist in reiner Form gewonnen und hat die Formel $C_{11}H_{11}N_2O_2Br$ resp. $C_{11}H_{11}N_2O_2Cl$, das heißt, sie ist ein Monohalogensubstitutionsprodukt der Indolaminopropionsäure. Für die von früheren Autoren behauptete Existenz verschiedener roter Tryptophanhalogenverbindungen ist kein Anhalt gefunden worden. Diese älteren Befunde waren mit unreinem Ausgangsmaterial sowie infolge des Vorliegens von Gemischen des roten mit dem gelben Körper zustande gekommen.

3. Durch überschüssiges Halogen werden der rote Chlor- oder Bromkörper in gelbe Substanzen umgewandelt, die früher auch nicht in annähernd reinem Zustand erhalten waren. Sie haben

die Zusammensetzung $C_{11}H_{11}N_2O_2Br_3$ resp. $C_{11}H_{11}N_2O_2Cl_3$ und sind Perhalogenide der roten Körper. Zwei Halogenatome sind relativ locker gebunden und lassen sich auf verschiedensten Wegen entfernen, wobei die roten Körper zurückgebildet werden.

4. Unzweifelhaft sind die älteren Autoren deshalb zu etwas abenteuerlichen Formeln für die gefärbten Halogenverbindungen des Tryptophans und dieses selbst gelangt, weil in den ersteren Ge mische des gelben und roten Körpers vorgelegen haben, die außerdem noch anderweitig (namentlich mit Schwefelverbindungen) verunreinigt waren.

5. Die älteren Angaben über einen Schwefelgehalt der Halogentryptophanverbindungen sind irrig und sind auf schwefelhaltige, dem Eiweiß entstammende Begleiter der Indolaminopropionsäure zurückzuführen. Tatsächlich erhält man bei einer Zugabe von Cystinfraktionen zu reinem Tryptophan auf Zusatz von Halogenwasser schwefelhaltige Farbstoffe.

6. Die Darstellung von reiner Indolaminopropionsäure kann vorteilhaft auch aus Fibrin erfolgen, das vor dem bisher gebrauchten Kasein den Vorzug schnellerer und leichterer Verdaulichkeit besitzt. Aus einem 600 g Trockensubstanz entsprechenden Quantum erhält man mit der von Neuberg angegebenen Modifikation des Darstellungsverfahrens 8 g.

7. Mit der Gewinnung von Indolaminopropionsäure kann zweckmäßig die von Tyrosin verbunden werden, das man vorher durch einfaches Eindampfen der ursprünglichen Verdauungslösung abscheiden kann, ohne daß dabei die Ausbeute an Tryptophan beeinträchtigt wird.

Die vorliegende Arbeit ist in der chemischen Abteilung des Pathologischen Institus zu Berlin im Sommersemester 1906 unter Leitung des Prof. Dr. C. Neuberg ausgeführt.

Dem Vorsteher der Abteilung, Herrn Geheimen Medizinalrat Prof. Dr. E. Salkowski danke ich für das Interesse, das er meiner Arbeit entgegengebracht hat und Herrn Prof. Neuberg für die Anregung und Unterstützung bei der Ausführung der Versuche.

Thesen.

I.

Zur Feststellung der Anwesenheit von Tuberkelbazillen im Harn genügt nicht immer die mikroskopische Untersuchung; es ist vielmehr der Tierversuch in geeigneter Anordnung notwendig.

II.

Die Zuckerbildung im Organismus aus Fett ist noch nicht endgültig erwiesen.

III.

Die Bedeutung des heterozyklischen Komplexes der Eiweißkörper für die Ernährungsphysiologie ist bisher unterschätzt worden.

Lebenslauf.

Der Verfasser dieser Arbeit wurde am 19. Mai 1883 als Sohn des Staatsrats Alexander Popowsky zu Charkow (Rußland) geboren und ist griechisch-katholischer Konfession. Vom Jahre 1893 bis 1901 besuchte er das Odessaer Dritte Gymnasium, welches er mit der goldenen Medaille absolvierte. Im selben Jahre wurde er an der Odessaer Neurussischen Universität immatrikuliert und studierte daselbst sieben Semester lang Medizin.

Im Sommer 1902 arbeitete er an der Universität zu Grenoble (Frankreich) unter der Leitung des Prof. Dr. Léger in Parasitologie. Im Sommer 1903 besuchte er die Vorlesungen in Oxford (University Extension Summer Meeting).

Im Jahre 1904 bestand er an der Universität zu Odessa das Apothekergehilfen-Examen. Im selben Jahre famulierte er vier Monate hindurch an dem Sophien-Krankenhaus in Smiela unter der Leitung des Priv.-Doz. Dr. B. Kozlowsky. Während des Sommersemesters 1905 besuchte er die Vorlesungen an der Universität zu Heidelberg. Seitdem ist er an der Kgl. Friedrich-Wilhelm-Universität zu Berlin immatrikuliert.